

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**



MINISTÈRE DES AFFAIRES ÉCONOMIQUES

N° 877.356

Classif. Internat. :

C07J/A61K/C07C

Mis en lecture le :

15 -10- 1979

Le Ministre des Affaires Economiques,

*Vu la loi du 24 mai 1854 sur les brevets d'invention :**Vu la Convention d'Union pour la Protection de la Propriété Industrielle :**Vu le procès-verbal dressé le 28 juin 1979 à 15 h.50**au Service de la Propriété industrielle;***ARRÊTE :**

Article 1. — Il est délivré à la Sté dite : WISCONSIN ALUMNI RESEARCH FOUNDATION,

614 North Walnut Street, Madison, Wisconsin 53705,
(Etats-Unis d'Amérique),

repr. par l'Office Kirkpatrick-G.C. Plucker à Bruxelles,

un brevet de perfectionnement pour : Procédé de préparation de composés 1 d -
hydroxylés,

breveté en sa faveur le 16 janvier 1979 sous le n° 873.512,
perfectionnement qu'elle déclare avoir fait l'objet de
demandes de brevet déposées aux Etats-Unis d'Amérique le
15 janvier 1979, n° PCT/US 79/00024 et le 21 mai 1979,
n° 041079 au nom de H.F. De Luca, H.K. Schnoes, H.E.
Paaren et D.E. Hamer dont elle est l'ayant cause.

Article 2. — Ce brevet lui est délivré sans examen préalable, à ses risques et périls, sans garantie soit de la réalité, de la nouveauté ou du mérite de l'invention, soit de l'exactitude de la description, et sans préjudice du droit des tiers.

Au présent arrêté demeurera joint un des doubles de la spécification de l'invention (mémoire descriptif et éventuellement dessins) signés par l'intéressé et déposés à l'appui de sa demande de brevet.

Bruxelles, le 13 juillet 1979.

PAR DELEGATION SPECIALE :

L. SALPETEUR
Directeur

877358

MÉMOIRE DESCRIPTIF

DÉPOSÉ A L'APPLI D'UNE DEMANDE

DE

BREVET DE PERFECTIONNEMENT AU
BREVET D'INVENTION
N° 873.512 DU 16 JANVIER 1979

FORMÉE PAR

WISCONSIN ALUMNI RESEARCH FOUNDATION

p o u r

Procédé de préparation de composés 1α -hydroxylés.

Demande de brevet PCT N° PCT/US 79/00024 du 15 janvier 1979 et
demande de brevet aux Etats-Unis d'Amérique n° 041049 du 21 mai
1979 en faveur de H. F. DeLUCA, H. K. SCHNOES, H. E. PAAREN et
D. E. HAMER

MDB. 5

N 31343

La présente invention se rapporte à un procédé de préparation de composés ayant une activité analogue à celle de la vitamine D et à des composés intervenant comme intermédiaires clés dans ce procédé, et en particulier à ceux qui comprennent une fonction oxygénée sur l'atome de carbone 1 de la molécule.

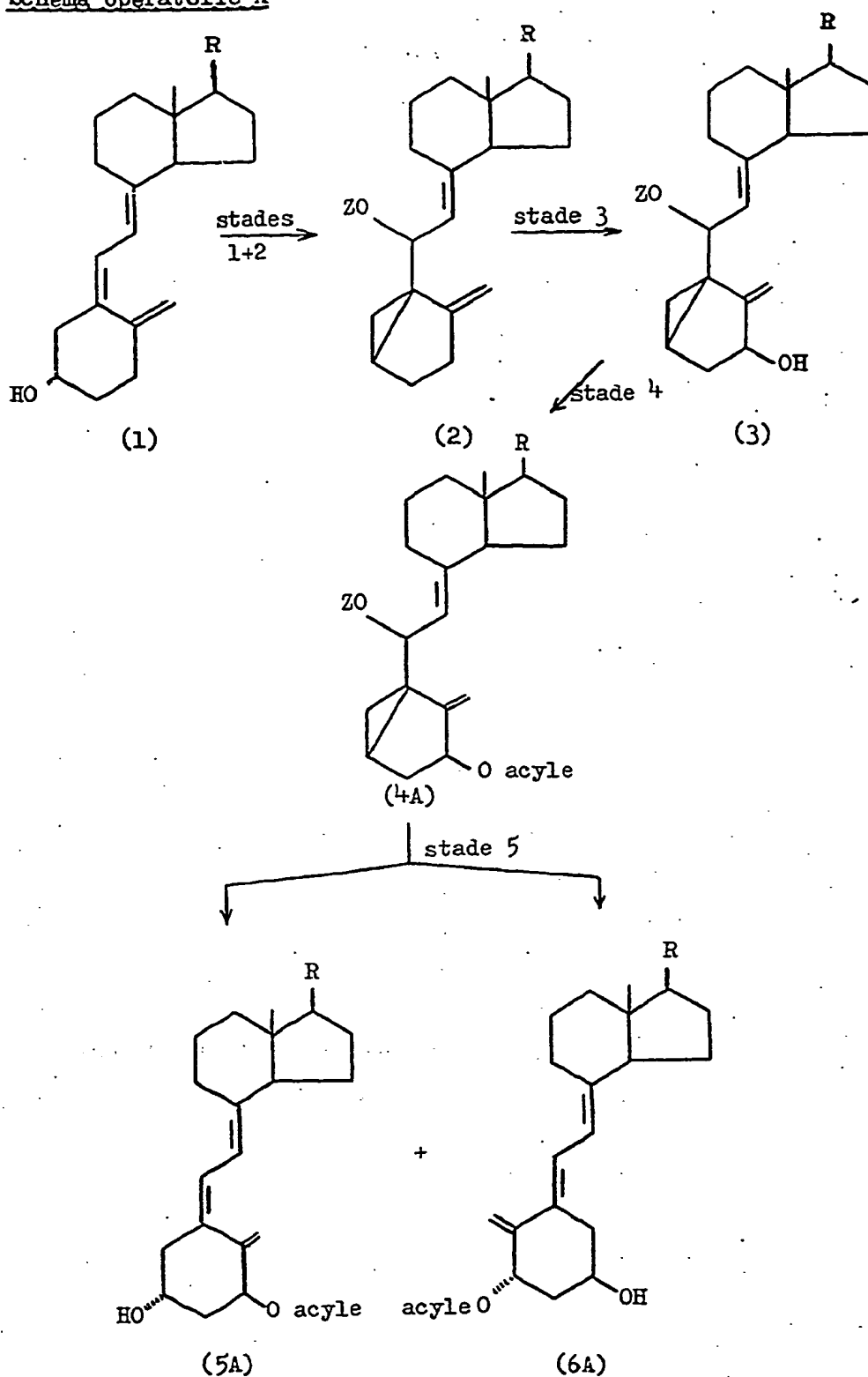
On sait que les vitamines D exercent certains effets biologiques, comme la stimulation de l'absorption du calcium dans l'intestin, la stimulation de la résorption minérale osseuse et la prévention du rachitisme. On sait aussi que cette activité biologique dépend de l'altération in vivo de ces vitamines, c'est-à-dire de leur métabolisme, en dérivés hydroxylés. Par exemple, on a pu établir que la $\alpha,25$ -dihydroxyvitamine D_3 est la forme active in vivo de la vitamine D_3 et est le composé qui exerce les effets biologiques précités.

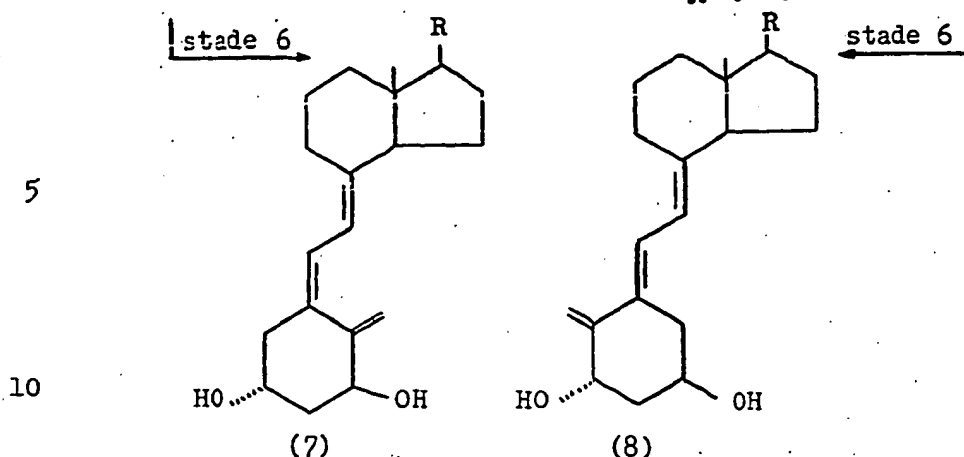
Les α -hydroxyvitamines D synthétiques analogues, comme la α -hydroxyvitamine D_3 et la α -hydroxyvitamine D_2 , exercent aussi un effet biologique marqué et ces composés, de même que les métabolites naturels, offrent beaucoup d'intérêt comme agents pour le traitement de différents troubles des os et du métabolisme du calcium, tels que l'ostéodystrophie, l'ostéomalacie et l'ostéoporose.

La plupart des procédés de préparation de ces analogues comprennent l'hydroxylation en position 1 d'un stéroïde précurseur convenable, puis la conversion du 1-hydroxystéroïde en la 1-hydroxyvitamine D désirée. Récemment, un procédé général de préparation des 1-hydroxyvitamines D, qui diffère radicalement des procédés antérieurs, a été proposé. Ce procédé, mis au point par Paaren et al (Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 75, 2080-2081) comprend l'hydroxylation directe d'une vitamine D précurseur conduisant avec un rendement élevé au composé α -hydroxylé correspondant. Ce procédé peut être illustré par le schéma opératoire ci-après.

35

40

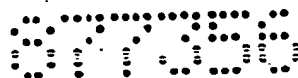
Schéma opératoire A



Les différents stades sont les suivants :

- 15 Stade (1) : p-toluènesulfonylation d'une β -hydroxyvitamine D de départ (comme la vitamine D₃, la vitamine D₂, la 25-hydroxyvitamine D₃, etc.) pour la formation du dérivé 3-O-p-toluènesulfonylé qui est soumis directement à la
- 20 Stade (2) : solvolysé dans un solvant alcoolique (ZOH où Z représente un radical méthyle, éthyle, propyle, etc., ou un atome d'hydrogène) conduisant à la cyclovitamine intermédiaire (2) et, si la chose est désirée, lorsque Z représente un atome d'hydrogène, acylation dans les conditions normales (par exemple anhydride acétique/pyridine) conduisant au composé correspondant dont Z représente un radical acyle inférieur ou acyle aromatique
- 25 Stade (3) : introduction du radical hydroxyle en position 1 α par oxydation allylique au moyen de dioxyde de sélénium conduisant au composé intermédiaire (3)
- 30 Stade (4) : protection de la fonction 1 α -hydroxyle dans le dérivé 1 α -O-acylé (4A) dont le radical acyle peut être tout radical acyle approprié, par exemple formyle, acétyle, benzoyle, etc.
- Stade (5) : solvolysé du composé intermédiaire (4A) au moyen d'acide p-toluènesulfonique comme catalyseur pour la formation de la 1 α -O-acyl-3 β -hydroxyvitamine D (5A) et de l'isomère 5,6-trans correspondant (6A)
- 35 Stade (6) : fractionnement du mélange par chromatographie et hydrolyse alcaline (ou scission réductrice) du radical acyle conduisant à la 1 α -hydroxyvitamine D (7) et, si la chose est désirée au composé 5,6-trans correspondant (8).

40 Ce procédé constitue une voie fort commode et efficace de synthèse des 1 α -hydroxyvitamines D (et/ou de leurs isomères



5,6-trans) à partir de vitamines D de départ convenables. De plus, le procédé est fort général du fait que la chaîne latérale R du composé de départ peut être l'une quelconque des chaînes latérales courantes se prêtant elles-mêmes à la substitution par de très nombreux radicaux fonctionnels, notamment hydroxyle, alkyle, O-acyle, halogène, céto, carboxyle, amido, ou à la non-saturation.

La Demanderesse a découvert à présent un procédé qui améliore et abrège le procédé décrit. Elle a en effet établi que dans des conditions appropriées, la α -hydroxycyclovitamine D intermédiaire (formule 3 dans le schéma ci-dessus) peut être solvolysée directement, sans protection préalable du radical 1-hydroxyle sous forme de radical 1-O-acyle, pour donner un mélange de 5,6-cis- α -hydroxy-3-O-acylvitamine D et de 5,6-trans- α -hydroxy-3-O-acylvitamine D, qui peuvent être séparées et converties en la α -hydroxyvitamine D désirée (ou l'isomère 5,6-trans correspondant).

Il est évident que le radical α -hydroxyle était protégé dans le procédé initial par conversion en radical α -O-acyle en raison de la prévision raisonnable que la fonction α -hydroxyle allylique sensible subirait une dégradation pendant la solvolyse à l'aide d'un acide relativement fort, comme l'acide p-toluènesulfonique. L'expérience a en fait démontré que la solvolyse d'une α -hydroxycyclovitamine D non protégée conduit dans de telles conditions à une décomposition importante et à un mélange complexe contenant des produits non désirés. Les auteurs du procédé précité indiquent aussi qu'après protection du radical α -hydroxyle sous forme de radical α -O-acyle, le produit de solvolyse recherché est obtenu avec un bon rendement, mais que la protection n'empêche pas complètement la décomposition indésirée pendant la solvolyse au moyen d'acide p-toluènesulfonique comme catalyseur. Ils ont en outre observé que la décomposition peut être réduite au minimum par solvolyse de la α -O-acylcyclovitamine dans l'acide acétique ou formique. Néanmoins, dans ces conditions, ces auteurs obtiennent un mélange de la 5,6-cis-1,3-di-O-acylvitamine D et de la 5,6-trans-1,3-di-O-acylvitamine D fort difficiles à séparer, et l'avantage qui consiste dans la réduction jusqu'au minimum des réactions de décomposition est annulé par les pertes dues à une chromatographie compliquée inévitable. Lorsque les substituants aux atomes de carbone 1 et 3 sont de même caractère (par exemple sont tous deux des radicaux hydroxyle ou O-acyle), la séparation de la forme 5,6-cis et de la forme 5,6-trans de ces vitamines D

0735

est difficile. Pour éviter les difficultés de cette séparation, les auteurs ont suggéré un schéma suivant lequel une 1-O-acylcyclovitamine D (dont le radical acyle peut être un radical acyle quelconque, à l'exception du radical formyle) est solvolysée dans l'acide formique pour donner un mélange de 5,6-cis-1 α -O-acyl-3 β -O-formylvitamine D et de 5,6-trans-1 α -O-acyl-3 β -O-formylvitamine D. Le radical formyle est alors éliminé au cours d'une hydrolyse sélective qui donne un mélange de 5,6-cis-1 α -O-acyl-3 β -hydroxyvitamine D et de 5,6-trans-1 α -O-acyl-3 β -hydroxyvitamine D, qu'il est possible de séparer commodément et de traiter suivant les indications du stade 6 du schéma ci-dessus. Toutefois, cette variante fait exécuter un stade de réaction supplémentaire (hydrolyse sélective du radical formyle).

Une particularité spécialement avantageuse de l'invention est qu'elle supprime tant les réactions de décomposition indésirables que la nécessité de protéger et déprotéger le radical hydroxyle. Le procédé perfectionné de l'invention est illustré par le schéma opératoire ci-après.

Schéma opératoire B

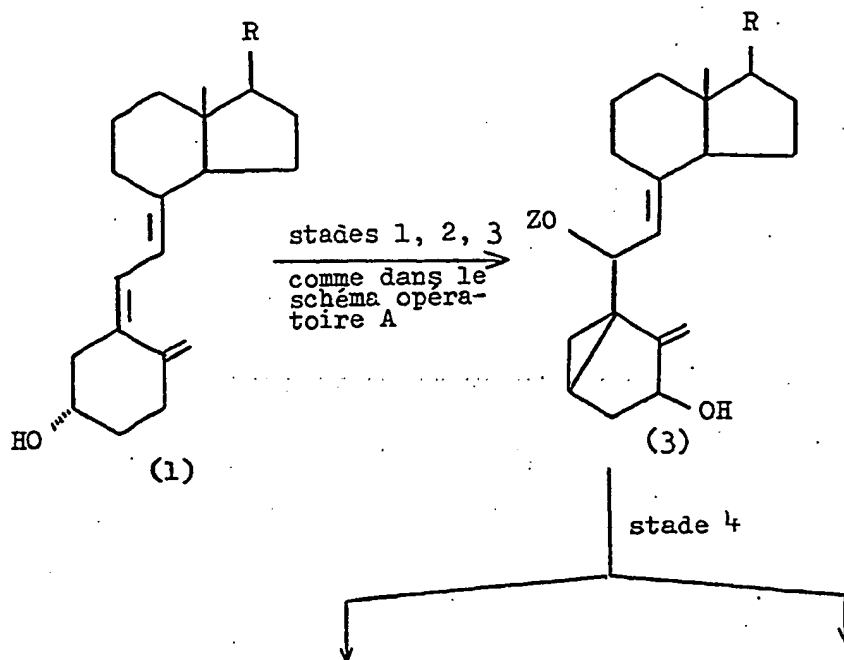
20

25

30

35

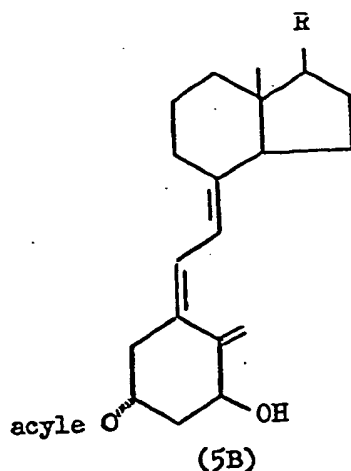
40



07358

5

10



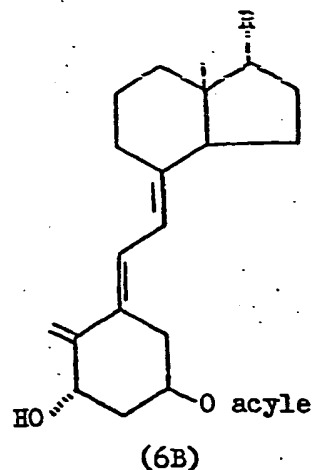
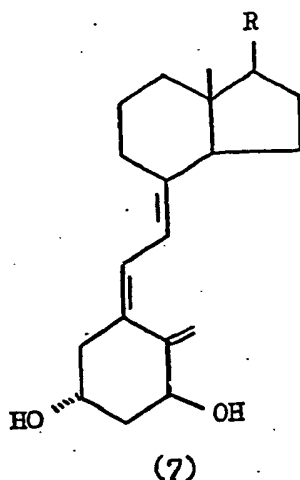
15

stade 5

20

25

30



stade 5

(8)

Les stades 1, 2 et 3 sont identiques aux stades correspondants du schéma opératoire A pour d'autres détails desquels il convient de se référer à Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. loc. cit. Le stade 4 est le nouveau stade décisif de solvolysé directe de la 1 α -hydroxycyclovitamine D intermédiaire (3) en présence d'un acide carboxylique de bas poids moléculaire (comme l'acide formique ou acétique) conduisant à la 1 α -hydroxy-3-O-acyl-5,6-cis-vitamine D (5B), de même qu'à la 1 α -hydroxy-3-O-acyl-5,6-trans-vitamine D

07758

(6B) (dont le radical acyle est évidemment celui de l'acide utilisé pour la solvolysé).

Le stade 5 est analogue au stade 6 du schéma opératoire A et comprend la séparation de la α -hydroxy-3-O-acyl-cis-vitamine D 5 et de la α -hydroxy-3-O-acyl-trans-vitamine D, puis l'élimination du radical 3-acyle par hydrolyse ou réduction conduisant à la α -hydroxyvitamine D (7) ou, si la chose est désirée, à la 5,6-trans- α -hydroxyvitamine D (8).

Le procédé de l'invention offre des avantages pratiques 10 importants. Ainsi,

(a) la synthèse est exécutée dans son ensemble en un plus petit nombre de stades, du fait que la protection du radical hydroxyle et/ou l'hydrolyse du radical formyle sont supprimées;

(b) la solvolysé directe donne un mélange qui contient la 15 α -hydroxy-3-O-acylvitamine D recherchée et la α -hydroxy-3-O-acyl-5,6-trans-vitamine D correspondante sans contamination par différents produits de dégradation qui apparaissent lorsque l'acide p-toluènesulfonique est le catalyseur pour la solvolysé;

(c) la suppression des produits de dégradation indésirables 20 simplifie la séparation des formes cis et trans obtenues par solvolysé;

(d) la brièveté du schéma opératoire et la commodité de séparation des isomères cis et trans rendent le nouveau procédé préférable 25 strielle;

(e) la suppression d'un stade opératoire et l'absence de produits de dégradation indésirables améliore le rendement en composés α -hydroxylés recherchés.

La solvolysé directe conforme à l'invention est exécutée 30 avec avantage par dissolution de la cyclovitamine dans un acide carboxylique organique de bas poids moléculaire et par bref chauffage du mélange résultant. Les acides préférés sont l'acide formique et l'acide acétique, et la réaction est exécutée avec avantage à une température de 40 à 60°C en 15 à 30 minutes. Si la 35 chose apparaît favorable ou requise, un cosolvant inerte tel que le tétrahydrofuranne ou le dioxanne peut être utilisé conjointement avec l'acide organique carboxylique pour améliorer la solubilité de la 1-hydroxycyclovitamine. La solvolysé conduit à un mélange (généralement dans le rapport 3:1) de la α -hydroxy-3-O-40 acylvitamine D et de la α -hydroxy-3-O-acyl-5,6-transvitamine D,

contenant le radical acyle provenant de l'acide organique utilisé pour la solvolysé. Par exemple, la solvolysé de la α -hydroxy-3,5-cyclovitamine D₃ dans l'acide acétique glacial donne du 3-acétate de α -hydroxyvitamine D₃ et du 3-acétate de α -hydroxy-5,6-trans-vitamine D₃. La formation de la fonction 3-O-acétyl pendant la solvolysé est une particularité fort désirable et avantageuse du procédé, parce que les isomères 5,6-cis et 5,6-trans des α -hydroxy-3-O-acylvitamines D₃ peuvent être séparés aisément par chromatographie. Des procédés chromatographiques appropriés

10 sont notamment la chromatographie en couche mince sur gel de silice, qui est classique, la chromatographie liquide sous haute pression et pour le travail à une plus grande échelle la chromatographie sur colonne de gel de silice où la chromatographie liquide sous haute pression dans des colonnes préparatives.

15 Après cette séparation, le radical 3-O-acyle peut être éliminé par hydrolyse en milieu alcalin ou par réduction à l'aide d'un hydrure, le mode opératoire choisi dépendant principalement de la nature des autres fonctions que peut contenir la molécule. Par exemple, la réaction d'une solution méthanolique d'une α -hydroxy-3-O-acylvitamine D (ou de son isomère 5,6-trans) avec de

20 l'hydroxyde de sodium aqueux à 5% pendant 1 à 2 heures à 25 - 50°C élimine quantitativement le radical acyle et conduit à la 1,3-dihydroxyvitamine D recherchée. Une solution étherée d'une α -hydroxy-3-O-acylvitamine D (ou de son isomère 5,6-trans) réagissant

25 avec un excès d'hydrure de lithium-aluminium pendant 30 minutes à la température ambiante conduit au même résultat.

La 5,6-trans- α -hydroxyvitamine D obtenue suivant ce procédé peut évidemment être convertie en 5,6-cis- α -hydroxyvitamine D par irradiation en lumière ultraviolette suivant le mode opératoire

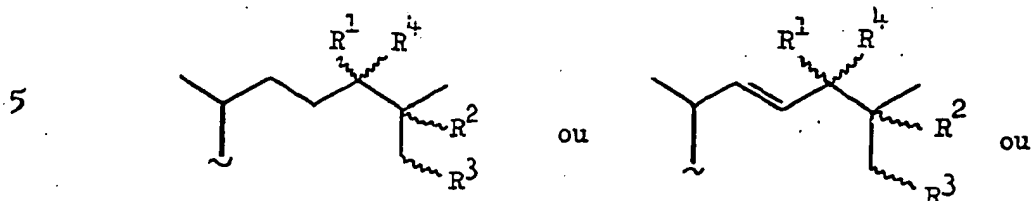
30 re général de Inhoffen et al. [Chem. Ber. 90, 2544 (1957)]. De même, les α -hydroxy-3-O-acyl-5,6-trans-vitamines D intermédiaires résultant de la solvolysé peuvent être converties en isomères 5,6-cis correspondants, qui donnent les α -hydroxyvitamines D par élimination du radical acyle de la manière décrite ci-dessus.

35 Tout comme le procédé original, le procédé de l'invention est fort général. Il est applicable aux vitamines D portant l'une quelconque des chaînes latérales habituelles des stéroïdes. Par conséquent, l'invention procure un procédé de préparation d'un composé de formule (7) ou (8) où R représente un atome d'hydrogène,

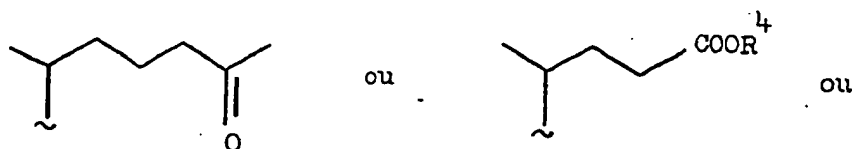
40 un radical alkyle inférieur (par exemple méthyle, éthyle, propyle,

07050

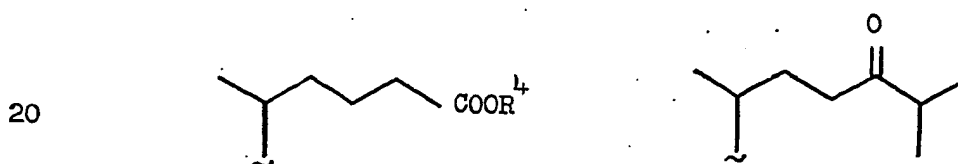
i-propyle, butyle ou i-butyle), ou un radical de formule :



10



15



dans lesquelles R^1 , R^2 et R^3 représentent chacun indépendamment un atome d'hydrogène ou de fluor ou un radical hydroxyle, alkyle inférieur 0-alkyle inférieur, 0-acyle inférieur ou 0-acyle aromatique, et R^4 représente un atome d'hydrogène ou un radical alkyle inférieur, suivant lequel on soumet une 1 α -hydroxycyclovitamine D de formule (3) où R est tel que défini ci-dessus, et Z représente un atome d'hydrogène ou un radical alkyle inférieur, acyle inférieur ou acyle aromatique à la solvolysé en présence d'un acide carboxylique organique de bas poids moléculaire, puis on convertit la 1 α -hydroxy-3-0-acylvitamine D₃ et/ou son isomère 5,6-trans résultant en le composé 3-hydroxylé correspondant.

35 Une autre particularité intéressante de l'invention est que la solvolysé directe donne des vitamines D et des 5,6-trans-vitamines D dans lesquelles le radical hydroxyle sur l'atome de carbone 3 est spécifiquement acétylé de manière plus aisée. Ces composés ont beaucoup d'utilité, en particulier lorsqu'une modification (par exemple oxydation, substitution, etc.) du radical hy-

40

droxyle sur l'atome de carbone 1 est désirée sans qu'une influence soit exercée sur le radical hydroxyle de l'atome de carbone 3, dont la préparation par d'autres procédés est généralement plus fastidieuse et difficile.

5 Aux fins de l'invention, il convient d'entendre par "radical alkyle inférieur" un radical hydrocarboné en chaîne droite ou ramifiée (saturé ou non saturé) de 1 à environ 5 atomes de carbone, par "radical acyle inférieur" un radical acyle de 1 à environ 4 atomes de carbone (par exemple formyle, acétyl ou butyryl) et par "radical acyle aromatique" un radical benzoyl ou benzoyl substitué (par exemple p-nitrobenzoyl).

10 L'invention est davantage illustrée par les exemples suivants.

EXEMPLE 1.-

15 On chauffe à 55°C pendant 15 minutes une solution de 10 mg de α -hydroxy-6-méthoxy-3,5-cyclovitamine D₃ dans 1,0 ml d'acide acétique glacial. On ajoute le mélange de réaction refroidi goutte à goutte à une solution agitée formée de glace et d'une solution saturée de bicarbonate de sodium, puis on soumet
20 le mélange neutralisé résultant à l'extraction par l'éther. On lave les extraits organiques une fois avec une solution saturée de bicarbonate de sodium et une fois avec de l'eau, puis on les sèche sur du sulfate de magnésium et on en chasse le solvant sous vide. On applique l'huile résiduelle brute ainsi obtenue sur
25 une plaque de gel de silice de 20 cm x 20 cm (d'une épaisseur de 750 microns) pour chromatographie en couche mince qu'on développe avec un mélange 3:1 de Skellysolve B et d'acétate d'éthyle pour obtenir 5,8 mg de 3-acétate de α -hydroxyvitamine D₃ [spectre ultraviolet λ_{max} 264 nm; spectre de masse, m/e : 442 (M⁺, 40), 382
30 (65), 364 (15), 269 (20), 134 (100); spectre de résonance magnétique nucléaire, δ , 0,54 (3H, s, 18-H₃), 0,86 (6H, d, J = 6,6 Hz, 26-H₃ et 27-H₃), 0,92 (3H, d, J = 6,0 Hz, 21-H₃), 2,04 (3H, s, 3-OCOCH₃), 4,41 (1H, m, 1-H), 5,02 (1H, m (fin), 19 (Z)-H), 5,21 (1H, m, 3-H), 5,34 (1H, m (fin), 19(E)-H), 6,02 (1H, d, J = 11,1
35 Hz, 7-H), 6,34 (1H, d, J = 11,1 Hz, 6-H)] et 2,0 mg de 3-acétate de 5,6-trans- α -hydroxyvitamine D₃ [spectre ultraviolet λ_{max} 273 nm; spectre de masse, m/e : 442 (M⁺, 10), 382 (80),
269 (23), 134 (100); spectre de résonance magnétique nucléaire, δ , 0,54 (3H, s, 18-H₃), 0,87 (6H, d, J = 6,3 Hz, 26-H₃ et 27-H₃);
40 0,92 (3H, d, J = 6,1 Hz, 21-H₃), 2,03 (3H, s, 3-OCOCH₃), 4,49 (1H,



m, 1-H), 4,99 (1H, m, (fin), 19(Z)-H), 5,13 (1H, m (fin), 19(E)-H), 5,25 (1H, m, 3-H), 5,80 (1H, d, $J = 11,4$ Hz, 7-H), 6,57 (1H, d, $J = 11,4$ Hz, 6-H)]. Par réaction du 3-acétate de α -hydroxyvitamine D_3 avec de l'hydroxyde de sodium méthanolique à 10% pendant 1 heure dans l'éthanol à 50°C, on obtient la α -hydroxyvitamine D_3 identique à un échantillon authentique. La réaction semblable du 3-acétate de 5,6-trans- α -hydroxyvitamine D_3 conduit à la 5,6-trans- α -hydroxyvitamine D_3 [spectre ultraviolet λ_{\max} 273 nm, spectre de masse, m/e : 400 (M^+ , 12), 382 (8), 152 (42), 134 (100), spectre de résonance magnétique nucléaire, δ , 0,56 (3H, s, 18- H_3), 0,87 (6H, d, $J = 6;6$ Hz, 26- H_3 et 27- H_3), 0,93 (3H, d, $J = 6,02$ Hz, 21- H_3), 4,24 (1H, m, 3-H), 4,50 (1H, m, 1-H), 4,97 (1H, m (fin), 19(Z)-H), 5,12 (1H, m (fin), 19(E)-H), 5,89 (1H, d, $J = 11,4$ Hz, 7-H), 6,58 (1H, d, $J = 11,4$ Hz, 6-H)].

15 EXEMPLE 2.-

On chauffe à 55°C pendant 15 minutes une solution de 8 mg de $\alpha,25$ -dihydroxy-6-méthoxy-3,5-cyclovitamine D_3 dans 800 μ litres d'acide acétique glacial, on refroidit la solution et on l'ajoute goutte à goutte à un mélange agité formé de glace et d'une solution saturée de bicarbonate de sodium. On extrait le mélange à l'éther, puis on lave l'extrait organique une fois avec une solution saturée de bicarbonate de sodium et une fois avec de l'eau, après quoi on le sèche sur du sulfate de magnésium et on le concentre sous vide. On chromatographie l'huile résultante sur une plaque de gel de silice de 20 cm x 20 cm (d'une épaisseur de 750 microns) qu'on développe avec un mélange 3:2 de Skellysolve B et d'acétate d'éthyle pour recueillir 4,0 mg de 3-acétate de $\alpha,25$ -dihydroxyvitamine D_3 [spectre ultraviolet λ_{\max} 264 nm; spectre de masse, m/e: 458 (M^+ , 30) 398 (70), 380 (15), 134 (100), 59 (80); spectre de résonance magnétique nucléaire, δ , 0,55 (3H, s, 18- H_3), 1,22 (6H, s, 26- H_3 et 27- H_3), 0,92 (3H, d, $J = 6,0$ Hz, 21- H_3), 2,04 (3H, s, 3-OCOCH₃), 4,38 (1H, m, 1-H), 5,00 (1H, m (fin), 19(Z)-H), 5,20 (1H, m, 3-H), 5,34 (1H, m (fin), 19(E)-Z); 6,06 (1H, d, $J = 11,6$ Hz, 7-H), 6,42 (1H, d, $J = 11,6$ Hz, 6-H)] et 35 1,7 mg de 3-acétate de 5,6-trans- $\alpha,25$ -dihydroxyvitamine D_3 [spectre ultraviolet λ_{\max} 273 nm; spectre de masse, m/e : 458 (M^+ , 10), 398 (85), 380 (25), 124 (100), 59 (85); spectre de résonance magnétique nucléaire, δ , 0,54 (3H, s, 18- H_3), 1,23 (6H, s, 26- H_3 et 27- H_3), 0,92 (3H, d, $J = 6,0$ Hz, 21- H_3), 2,03 (3H, s, 3-OCOCH₃), 40 4,50 (1H, m, 1-H), 4,96 (1H, m (fin), 19(Z)-H), 5,10 (1H, m (fin),

19(E)-H), 5,28 (1H, m, 3-H), 5,80 (1H, d, J = 11,4 Hz, 7-H), 6,55 (1H, 3, J = 11,4 Hz, 6-H)]. Par hydrolyse du 3-acétate de 5,6-cis-1 α ,25-dihydroxyvitamine D₃ avec de l'hydroxyde de sodium à 10% dans le méthanol pendant 1 heure à 55°C, on obtient la 5 1 α ,25-dihydroxyvitamine D₃ identique sous tous rapports à un échantillon authentique. En traitant comme ci-dessus le 3-acétate de 5,6-trans-1 α ,25-dihydroxyvitamine D₃, on obtient la 5,6-trans-1 α ,25-dihydroxyvitamine D₃ [spectre ultraviolet λ_{\max} 273 nm; spectre de masse, m/e : 416 (15), 398 (8), 152 (40), 134 (100), 10 59 (95); spectre de résonance magnétique nucléaire, δ , 0,55 (3H, s, 18-H₃), 1,23 (6H, s, 26-H₃ et 27-H₃), 0,92 (3H, d, J = 6,0 Hz, 21-H₃), 4,22 (1H, m; 3-H), 4,53 (1H, m, 1-H), 4,95 (1H, π (fin), 19(Z)-H), 5,12 (1H, m (fin), 19(E)-H), 5,85 (1H, d, J = 11,4 Hz, 7-H) et 6,55 (1H, d, J = 11,4 Hz, 6-H)].

15 EXEMPLE 3.-

On ajoute 1,0 ml d'acide formique à 98% à une solution de 12 mg de 1 α -hydroxy-6-méthoxy-3,5-cyclovitamine D₃ dans 1,0 ml de tétrahydrofurane sec. On chauffe le mélange de réaction à 55°C pendant 10 minutes, puis on arrête la réaction au moyen d'un 20 mélange de glace et de solution saturée de bicarbonate de sodium. On extrait la suspension aqueuse rapidement à l'éther et on lave les extraits organiques avec de l'eau, puis on les sèche sur du sulfate de magnésium et on les concentre sous vide. On applique l'huile brute sur une plaque de gel de silice de 20 cm x 20 cm, 25 d'une épaisseur de 750 microns, pour chromatographie en couche mince qu'on développe avec un mélange 4:1 de Skellysolve B et d'acétate d'éthyle pour obtenir 6,3 mg de 3-formiate de 1 α -hydroxyvitamine D₃ [spectre ultraviolet λ_{\max} 264 nm; spectre de masse, m/e : 428 (M⁺)] et 2,2 mg de 3-formiate de 5,6-trans-1 α -hydroxy- 30 vitamine D₃ [spectre ultraviolet λ_{\max} 273 nm; spectre de masse, m/e : 428 (M⁺)]. Par hydrolyse des esters formiques au moyen de bicarbonate de potassium dans le méthanol aqueux à 45°C pendant 30 minutes, on obtient la 1 α -hydroxyvitamine D₃ et l'isomère 5,6-trans correspondant qui sont identiques sous tous rapports 35 aux composés mentionnés dans l'exemple 1.

EXEMPLE 4.-

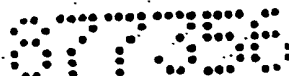
On ajoute 1,0 ml d'acide formique à 98% à une solution de 7,5 mg de 1 α ,25-dihydroxy-6-méthoxy-3,5-cyclovitamine D₃ dans 1,0 ml de tétrahydrofurane sec. Après 10 minutes de chauffage à 40 55°C, on arrête la réaction au moyen de glace et d'une solution

37358

saturée de bicarbonate de sodium, puis on extrait le mélange aqueux rapidement à l'éther. On lave les extraits étherés à l'eau et on les sèche sur du sulfate de magnésium, puis on les concentre sous vide. On chromatographie l'huile brute sur une plaque de gel de silice de 20 cm x 20 cm, d'une épaisseur de 750 microns, pour chromatographie en couche mince avec un mélange 3:2 de Skellysolve B et d'acétate d'éthyle pour obtenir 3,6 mg de 3-formiate de α ,25-dihydroxyvitamine D₃ [spectre ultraviolet λ_{\max} 264 nm; spectre de masse, m/e : 444 (M⁺)] et 1,3 mg de 3-formiate de 5,6-trans- α ,25-dihydroxyvitamine D₃ [spectre ultraviolet λ_{\max} 273 nm; spectre de masse, m/e : 444 (M⁺)]. Par simple hydrolyse dans le bicarbonate de potassium, on obtient l'isomère 5,6-cis et l'isomère 5,6-trans analogue qui sont identiques aux composés décrits dans l'exemple 2.

15 EXEMPLE 5.-

On chauffe à 60°C pendant 15 minutes une solution de 380 mg de α -hydroxy-6-méthoxy-3,5-cyclovitamine D₂ dans 8 ml d'acide acétique glacial. On refroidit le mélange de réaction et on l'ajoute lentement à une solution agitée formée de glace et d'une solution saturée de bicarbonate de sodium. Après neutralisation de la suspension aqueuse, on l'extrait avec de l'éther et on lave la phase organique une fois à l'eau, puis on la sèche sur du sulfate de magnésium. Après avoir chassé le solvant sous vide, on applique l'huile brute restante sur une colonne de 60 cm x 1,5 cm garnie de 45 g de gel de silice dans de l'hexane. Par élution en lots successifs avec 100 ml d'acétate d'éthyle à 4%, 100 ml d'acétate d'éthyle à 8% et 100 ml d'acétate d'éthyle à 12%, puis 400 ml d'acétate d'éthyle à 16%, on recueille des fractions de 6,0 ml. Les fractions 23 à 32 contiennent 180 mg de 3-acétate de α -hydroxyvitamine D₂ pur [spectre ultraviolet λ_{\max} 264 nm; spectre de masse, m/e : 454 (M⁺, 70), 394 (60), 376 (20), 269 (35), 134 (100)] tandis que les fractions 33 à 45 contiennent un mélange cis-trans et que les fractions 46 à 60 contiennent 60 mg de 3-acétate de 5,6-trans- α -hydroxyvitamine D₂ [spectre ultraviolet λ_{\max} 273 nm; spectre de masse; m/e : 454 (M⁺, 20); 394 (80), 376 (10), 269 (25), 134 (100)]. Par hydrolyse du 3-acétate de α -hydroxyvitamine D₂ avec de l'hydroxyde de sodium méthanolique à 10% à 50°C dans l'éthanol pendant 1 heure, on obtient la 5,6-cis- α -hydroxyvitamine D₂ identique sous tous rapports à un échantillon authentique préparé autrement [Lam et al., Steroids, 30, 671-677



(1977)] et par hydrolyse conduite de même de l'isomère 5,6-trans, on obtient la 5,6-trans-1 α -hydroxyvitamine D₂ [spectre ultraviolet λ_{\max} 273 nm; spectre de masse, m/e : 412 (25, M⁺), 394 (60), 376 (10), 269 (20), 152 (60), 134 (100)].

5 EXEMPLE 6.-

On chauffe à 60°C pendant 10 minutes une solution de 6,8 mg de 1 α ,25-dihydroxy-6-méthoxy-3,5-cyclovitamine D₂ [préparée à partir de 25-hydroxyvitamine D₂ suivant les procédés décrits par Paaren et al. (Proc. Nat. Acad. Sci., USA, 75, 2080 (1978)) pour la préparation de la 1 α -25-dihydroxycyclovitamine D₃ analogue correspondante] dans 0,5 ml d'acide acétique glacial, puis on l'ajoute goutte à goutte à un mélange de glace et de solution saturée de bicarbonate de sodium. On extrait ce mélange aqueux à l'éther, puis on lave les extraits organiques une fois avec de l'eau, après quoi on les sèche sur du sulfate de magnésium et on les concentre sous vide. Par chromatographie liquide sous haute pression du résidu huileux sur du gel de silice microparticulaire (produit vendu sous le nom de Zorbax-SIL par la Société DuPont, Wilmington, Delaware) au moyen de 10% d'isopropanol dans l'hexane comme solvant, on obtient 3,5 mg de 3-acétate de 1 α ,25-dihydroxyvitamine D₂ [spectre ultraviolet λ_{\max} 264 nm; spectre de masse, m/e : 472 (M⁺) et 412 (M⁺ -60)] et 1,3 mg de 3-acétate de 5,6-trans-1 α ,25-dihydroxyvitamine D₂ [spectre ultraviolet λ_{\max} 273 nm; spectre de masse, m/e : 472 (M⁺), 412 (M⁺ -60)]. Par hydrolyse des fonctions 3 β -acétoxy (hydroxyde de sodium à 5% dans le méthanol à 45°C pendant 45 minutes), on obtient la 1 α ,25-dihydroxyvitamine D₂ identique sous tous rapports à un échantillon authentique et la 5,6-trans-1 α ,25-dihydroxyvitamine D₂ [spectre ultraviolet λ_{\max} 273 nm; spectre de masse, m/e : 428 (M⁺)].

30 EXEMPLE 7.-

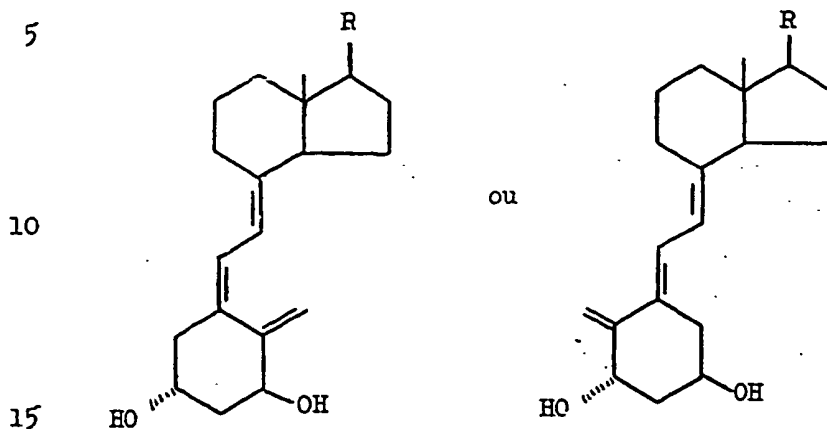
On chauffe à 55°C pendant 10 minutes une solution de 4,5 mg de 1 α ,24,25-trihydroxy-6-méthoxy-3,5-cyclovitamine D₃ [préparée à partir de 24,25-dihydroxyvitamine D₃, par p-toluène-sulfonylation à l'atome de carbone 3; solvolysée en 3,5-cyclovitamine et oxydation par le dioxyde de sélénium en composé 1 α -hydroxylé, comme décrit par Paaren et al., Proc. Nat. Acad. Sci. 75, 2080 (1978)] dans 0,3 ml d'acide acétique glacial, puis on arrête la réaction au moyen d'un mélange de glace et de solution saturée de bicarbonate de sodium. On extrait la solution aqueuse à l'éther, puis on lave les extraits organiques une fois à l'eau, après

877356

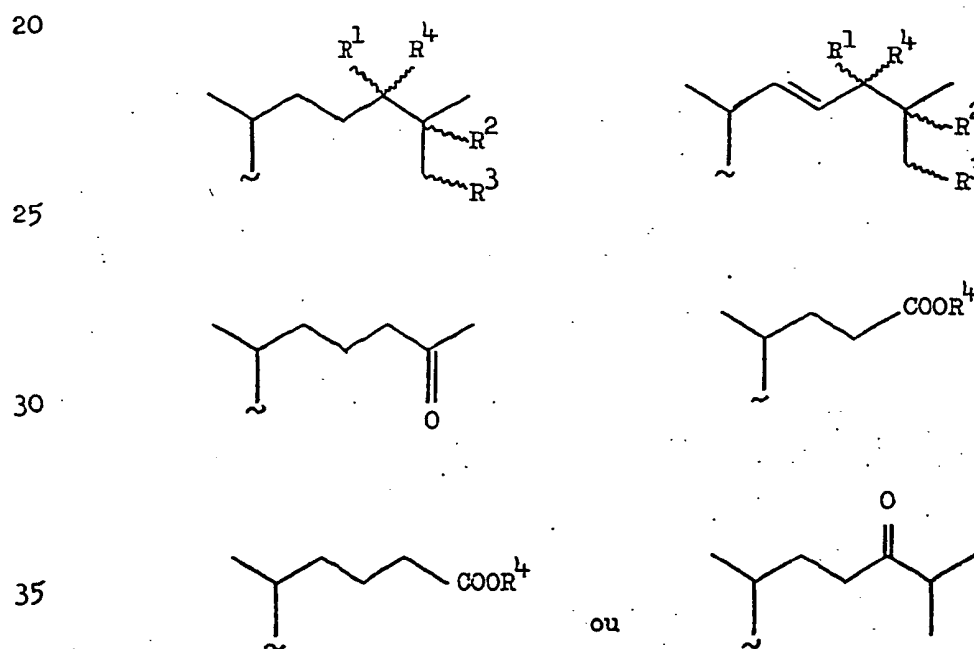
quoi on les sèche sur du sulfate de magnésium et on les concentre sous vide. Par chromatographie liquide à haute performance sur du gel de silice microparticulaire (Zorbax-SIL de la Société DuPont) au moyen de 12% d'isopropanol dans l'hexane comme solvant, 5 on obtient 2,0 mg de 3-acétate de $1\alpha,24,25$ -trihydroxyvitamine D_3 [spectre ultraviolet $\lambda_{\max} 264 \text{ nm}$] et 0,8 mg de 3-acétate de 5,6-trans- $1\alpha,24,25$ -trihydroxyvitamine D_3 isomère [spectre ultraviolet $\lambda_{\max} 273 \text{ nm}$]. Par hydrolyse alcaline (hydroxyde de sodium à 5% dans le méthanol à 45°C pendant 60 minutes) du 3-acétate de 10 $1\alpha,24,25$ -trihydroxyvitamine D_3 , on obtient la $1\alpha,24,25$ -trihydroxyvitamine D_3 identique sous tous rapports à un échantillon authentique. Par hydrolyse du 3-acétate de 5,6-trans- $1\alpha,24,25$ -trihydroxyvitamine D_3 dans les mêmes conditions, on obtient la 5,6-trans- $1\alpha,24,25$ -trihydroxyvitamine D_3 [spectre ultraviolet $\lambda_{\max} 273 \text{ nm}$; 15 spectre de masse, m/e : 432 (M^+)].

REVENDICATIONS

1.- Procédé de préparation d'une 1 α -hydroxyvitamine D de formule générale :

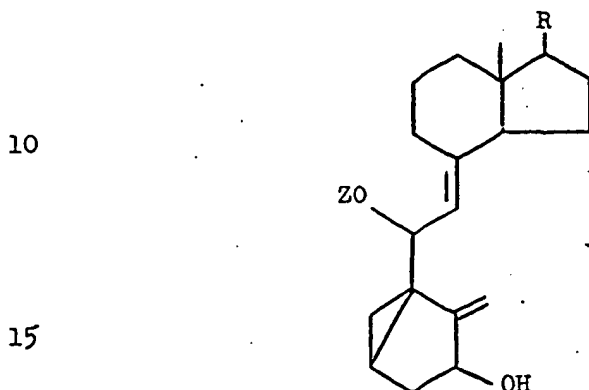


où R représente un atome d'hydrogène, un radical alkyle inférieur ou un radical de formule :



077058

formules dans lesquelles R^1 , R^2 et R^3 représentent chacun indépendamment un atome d'hydrogène ou de fluor ou un radical hydroxyle, alkyle inférieur, O-alkyle inférieur, O-acyle inférieur ou acyle aromatique, et R^4 représente un atome d'hydrogène ou un radical alkyle inférieur, caractérisé en ce qu'on soumet une α -hydroxycyclovitamine D de formule générale :



où Z représente un atome d'hydrogène ou un radical alkyle inférieur, acyle inférieur ou acyle aromatique, et R a la signification qui lui a été donnée ci-dessus, à la solvolysé en présence d'un acide carboxylique organique de bas poids moléculaire, puis on convertit la α -hydroxy-3-O-acylvitamine D et/ou la 5,6-trans- α -hydroxy-3,0-acylvitamine D résultantes en le composé 3-hydroxylé correspondant.

25 2.- Procédé suivant la revendication 1, caractérisé en ce qu'on sépare la α -hydroxy-3-O-acylvitamine D et/ou la 5,6-trans- α -hydroxy-3-O-acylvitamine D du mélange de solvolysé avant d'éliminer le radical 3-O-acyle.

3.- Procédé suivant la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce qu'on élimine le radical 3-O-acyle par hydrolyse en milieu alcalin.

4.- Procédé suivant la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce qu'on élimine le radical 3-O-acyle par réduction au moyen d'un hydrure.

35 5.- Procédé suivant l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que l'acide carboxylique organique est l'acide formique.

6.- Procédé suivant l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que l'acide carboxylique organique est 40 l'acide acétique.

877358

7.- Procédé suivant l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que la cyclovitamine D est la α -hydroxy-6-méthoxy-3,5-cyclovitamine D₃, la α -hydroxy-6-méthoxy-3,5-cyclovitamine D₂, la α ,25-dihydroxy-6-méthoxy-3,5-cyclovitamine D₃, la α ,25-dihydroxy-6-méthoxy-3,5-cyclovitamine D₂ ou la α ,24,25-trihydroxy-6-méthoxy-3,5-cyclovitamine D₃.

Bruxelles, le 28 juin 1979

P. Pon. de WISCONSIN ALUMNI RESEARCH FOUNDATION
OFFICE KIRKPATRICK - G. C. PLUCKER.

